DIFERENCIACION LONGITUDINAL DE LOS CROMOSOMAS. SU EMPLEO EN CITOTAXONOMIA.

FERNANDO N. DULOUT *

Introducción

Durante los últimos 20 años se produjeron significativos progresos en lo referente a técnicas de citogenética con microscopía óptica. La citogenética basada en el número, dimensiones y forma de los cromósomas de las especies han dado lugar a la actual citogenética molecular, que surge del empleo de método propios de la Bioquímica y la Biología Molecular aplicados al estudio del cariotipo.

Los cromosomas constituyen el ordenamiento dinámico y estable del material genético en grupos de ligamiento. En un sentido amplio, el término cromosoma designa tanto al ordenamiento de los genes en las bacterias y los virus, como a las pequeñas cantidades de ADN localizadas en los plástidos y en las mitocondrias y a las complejas estructuras nucleoproteicas de los núcleos de animales y plantas superiores. Sin embargo, si se acepta la disquisición hecha por Chatton (1920) (citado por Ris y Kubai, 1970) en seres procariotas (virus, bacterias y cianofitas) y seres eucariotas (animales y plantas con células nucleadas), se puede coincidir con Ris y Kubai (1970) en que el término cromosoma debe quedar restringido a estos últimos organismos y con ese sentido lo emplearemos.

Los cromosomas de una especie determinada tienen características que le son propias: Número, tamaño y forma. Este concepto constituye la base axiomática de la citotaxonomía y de hecho hace que el complemento cromosómico pueda ser considerado como uno de los componentes de la definición biológica de especie, analizable con sentido evolutivo y taxonómico.

En este trabajo se intentará presentar un panorama general de las distintas técnicas citomoleculares, haciendo especial referencia a su empleo para la resolución de problemas citotaxonómicos mediante ejemplos de su aplicación en cada caso particular.

I. Cromosomas compartidos. Concepto morfológico.

Cuando se estudian los cromosomas de especies filogenéticamente relacionadas, es posible determinar ciertas analogías entre los cariotipos. Los estudios morfométricos pueden revelar la existencia de cromosomas de igual tamaño y morfología en dos ó más especies. Cuando las evidencias no dejan lugar a dudas, estos cromosomas pueden considerarse como cromosomas compartidos por esas especies y corresponden a cromosomas del ancestro común que han permanecido inalterados a lo largo

* Instituto Multidisciplinario de Biología Celular (IMBICE). La Plata, Argentina.

de la evolución.

Un ejemplo claro de cromosomas compartidos se encuentra en distintas especies del género *Akodon* (1) (Rodentia, Cricetidae). En la Tabla I se ilustran las dimensiones del cromosoma 1 y del autosoma más pequeño de distintas especies de este género y de una especie del género relacionado, *Bolomys*.

En lo referente al cromosoma 1 de *Akodon* existen tres agrupamientos: las especies con cromosoma 1 acrocéntrico, de alrededor del 10% del complejo haploide; las especies con cromosoma 1 metacéntrico, con brazo largo del 10% y brazo corto del 9% del complejo haploide y las especies con cromosoma 1 acrocéntrico de aproximadamente el 6% del complejo haploide. *A. illuteus* posee un cromosoma 1 distinto de las demás especies, ya que solamente compartiría la porción correspondiente al brazo largo, que por otra parte podría ser una porción cromosómica compartida por todas las especies excepto *A. longipilis* y *A. xanthorhinus*. En cuanto al autosoma más pequeño, que es metacéntrico, aparece compartido por todas las especies.

En síntesis, si se tienen en cuenta solamente las características morfométricas del cariotipo, el cromosoma compartido puede definirse como el cromosoma ó segmento cromosómico que presenta la misma morfología y el mismo tamaño en especies filogenéticamente relacionadas.

II. Duplicación cromosómica

La citogenética molecular se inicia prácticamente con el desarrollo de las técnicas de estudio de la duplicación cromosómica mediante precursores radiactivos (Taylor *et al.*, 1957).

El método se basa en la incorporación de una base nitrogenada radiactiva a la molécula de ADN durante la duplicación y en la detección de la sustancia en los cromosomas en metafase gracias a la radiación emitida, mediante el empleo de técnicas radioautográficas. La sustancia más empleada es la timidina tritiada, ya que la base timina es exclusiva del ADN y el tritio, un emisor β débil, no produce o produce escaso daño cromosómico y puede ser detectado fácilmente. Los átomos de tritio se incorporan a la molécula de timina en reemplazo de los átomos de hidrógeno del grupo metilo en el Carbono 5.

Los trabajos efectuados por medio de esta técnica permitieron la determinación de una serie de hechos:

a) El material genético se duplica durante la interfase, en el período denominado S. De esta manera, el ciclo celular consta de un período presintético, llamado G_1; un período de síntesis (S); un período post-sintético (G_2) y la mitosis (Taylor, 1963).
b) La duración del ciclo celular es, en general, constante para cada tipo celular en un determinado individuo ó especie.
c) Los cromosomas no se duplican simultáneamente, sino que lo hacen siguiendo una cronología y un orden definido (Taylor, 1960).
d) De acuerdo a la forma en que se replican los cromosomas, el período S puede dividirse en cuatro etapas: inicial (S_1); media (S_2); tardía (S_3) y final (S_4) (Bianchi et al., 1965).
e) Mediante la determinación de ciertos parámetros es posible medir la duración del ciclo celular y de cada uno de los períodos que lo componen (Sisken, 1964).

Las técnicas radioautográficas se emplearon para determinar los modelos de duplicación cromosómica en distintas especies (Martin, 1966; Bianchi y Molina, 1966, Bianchi, *et al.*, 1969; Dulout *et al.*, 1974) como así mismo la forma de duplicación de determinadas porciones del genoma, como la heterocromatina (Taylor, 1960; Schmid, 1967; Lima de Faria y Jaworska, 1968; Citoler y Gropp, 1969; Citoler *et al.*, 1972; Fraccaro *et al.*, 1969; Nesbitt y Gartler, 1970; Schmid y Leppert, 1969; Bianchi, *et al.*, 1968; Zakharov y Egolina, 1968).

(1) Los nombres científicos mencionados en este trabajo corresponden a los nombres empleados por los autores en las publicaciones a que se hace referencia en cada caso.

Desde el punto de vista citotaxonómico, las técnicas de estudio de la duplicación cromosómica han brindado evidencias importantes. En tal sentido puede mencionarse el trabajo de Bianchi y Bianchi (1969) sobre origen del modelo y cronología de la replicación cromosómica en vertebrados, en el que se compararon los modelos de duplicación cromosómica a nivel Género, a nivel Familia y a nivel Suborden.

A nivel Género, comparando el modelo de duplicación cromosómica de tres especies de *Akodon: A. azarae, A. varius* y *A obscurus*. A nivel Familia, con el estudio de dos marsupiales (Didelphidae), *Didelphis azarae* y *Lutreolina crassicaudata*. A nivel Suborden, con el análisis de la duplicación cromosómica de cuatro especies de serpientes: *Boa constrictor amarali, Xenodon merremii, Philodryas patagonensis* y *Bothrops jararaca*.

En el género *Akodon*, las especies *A. azarae, A. obscurus* y *A. varius* tienen el cromosoma 1 compartido (Tabla I). El estudio de la duplicación cromosómica revela que estos cromosomas comparten también el modelo de marcación radiactiva. Las regiones de duplicación tardía se localizan en el tercio proximal del cromosoma 1.

En la familia *Didelphidae*, las dos especies estudiadas tienen cariotipos semejantes, con $2n = 22$ y todos los autosomas acrocéntricos y de tamaño progresivamente decreciente (Tabla II). La comparación de los modelos de replicación cromosómica reveló que tanto los cromosomas de *Didelphis azarae* como los de *Lutreolina crassicaudata* presentan la misma marcación radiactiva durante el período S tardío.

En el Suborden Squamata, las especies *Boa constrictor amaraii, Xenodon merremii, Philodryas patagonensis* y *Bothrops jararaca* comparten los cromosomas 1, 2 y 3 (Tabla III). El análisis radioautográfico muestra que los tres pares de cromosomas tienen la misma marcación radiactiva al final del período S. Durante esa fase el cromosoma 1 de las 4 especies presenta marcación dispersa a todo lo largo. En el par 2 la radiactividad se detecta en el tercio medio del brazo corto y en la mitad distal del brazo largo. El par 3 exhibe una gran concentración de granos de plata en la región pericentromérica de ambos brazos.

Es decir que en la comparación interespecífica desde el nivel género al nivel suborden, los cromosomas de igual tamaño y morfología presentaron además la misma cronología y el mismo modelo de duplicación.

Esta evidencia permite en consecuencia ampliar el concepto de cromosoma compartido definido en I, diciendo que son los cromosomas ó segmentos cromosómicos que presentan la misma morfología y tamaño como así también la misma cronología y modelo de duplicación en especies filogenéticamente relacionadas.

III. Bandeo cromosómico

1. Bandas C

Las técnicas de ultracentrifugación analítica de los ácidos nucleicos en gradientes de densidad de sales de Cesio, solas o con el agregado de Plata o Mercurio, permitió detectar la existencia de dos clases de ADN en el genoma eucariótico: a) Un ADN principal, constituido por secuencias de bases únicas ó repetidas escaso número de veces, o repetidas y dispersas, las cuales constituyen la mayor parte del genoma. b) Un ADN satélite, formado por secuencias de bases repetidas entre 10.000 y 1.000.000 de veces y agrupadas en zonas restringidas de la molécula de ADN (Britten y Kohne, 1968).

El mayor progreso logrado en relación a la citogenética fue la localización de fracciones determinadas de ADN en el cromosoma metafásico, mediante técnicas de hibridación *in situ* de ARN radiactivo de secuencias de bases conocidas con ADN de preparados citológicos. Por medio de estas técnicas, Pardue y Gall (1970) por un lado y Jones (1970) por otro, de manera simultánea, determinaron que la mayor parte del ADN satélite de ratón se lo-

caliza en la región pericentromérica de todos los cromosomas, con excepción del Y. Este descubrimiento significó el acortamiento definitivo del camino que separaba a la Biología Molecular de la Citogenética a nivel óptico.

Durante el desarrollo de su trabajo Pardue y Gall observaron que cuando los preparados citológicos que habían sido tratados con soluciones débiles de hidróxido de sodio para desnaturalizar el ADN cromosómico se teñían con colorante de Giemsa, las regiones pericentroméricas se coloreaban con más intensidad que el resto. Sobre esta base, Arrighi y Hsu (1971) pusieron a punto una técnica sencilla para demostrar la coloración diferencial. La comprobación de que esta diferenciación se producía en otras especies aparte del ratón y que las regiones más coloreadas correspondían en la mayoría de los casos a la porción del centrómero, hizo que se las denominara como bandas C (Conferencia de París, 1971).

El enorme valor de este método consiste en que mediante procedimientos de coloración corrientes es posible poner en evidencia la ubicación en el cromosoma de familias de ADN con propiedades particulares, en este caso, la repetición de secuencias de bases. De acuerdo a esto, el concepto de cromosoma compartido se amplía, ya que no solo deben ser cromosomas o segmentos cromosómicos de igual tamaño y morfología con la misma cronología de duplicación, sino también con la misma localización de bandas C, es decir de ADN repetido.

2. Bandas Q

Los primeros intentos de caracterizar el ADN a nivel cromosómico fueron realizados por Casperson y colaboradores del Instituto Karolinska de Estocolmo. Partiendo de la premisa de que el Nitrógeno 7 de la guanina tiene una gran labilidad ante los agentes mutagénicos, se pensó que si se teñían cromosomas con una sustancia colorante en cuya molécula se hubiera incorporado una sustancia mutagénica, se obtendría una coloración diferencial más intensa en las regiones ricas en Guanina-Citosina (G-C) (Casperson y col., 1968). El colorante utilizado fue mostaza de quinacrina, donde al colorante fluorescente (quinacrina) se une la acción mutagénica de la mostaza nitrogenada. Los cromosomas de hámster coloreados con este producto y observados con microscopía de fluorescencia mostraban diferenciación longitudinal consistente en la presencia de regiones transversales muy fluorescentes y poco fluorescentes alternadas de tamaño y ubicación constante para cada par cromosómico. Más tarde se demostró que era posible inducir fluorescencia diferencial con dihidrocloruro de quinacrina y que en realidad, las regiones cromosómicas más fluorescentes eran aquellas ricas en Adenina-Timina (A-T) (Eillison y Barr, 1972).

En la Conferencia de Paris (1971) se acordó denominar a este tipo de diferenciación longitudinal como bandas Q.

3. Bandas G

Sumner y col. (1971) encontraron que si los preparados tratados con NaOH para obtener bandas C se incubaban en soluciones salinas, al colorear con Giemsa se producía una diferenciación semejante a las bandas Q. La correspondencia entre ambos tipos de bandas se confirmó al analizar metafases coloreadas secuencialmente con quinacrina y con este método. La diferenciación lograda por este medio recibió el nombre de bandas G (Conferencia de Paris, 1971).

Casi simultáneamente con Sumner y col., varios investigadores desarrollaron distintas variantes técnicas para obtener bandas G. Schnedl (1971), Drets y Shaw (1971) y Dev y col. (1972) desarrollaron distintos tratamientos con soluciones salinas luego del NaOH.

También se pueden obtener bandas G con el empleo de colorante de Giemsa a pH 9 (Patil *et al.*, 1971), pretratamiento con urea (Shiraishi y Yosida, 1972), detergentes (Kato y Moriwaki, 1972), calor (Lomholt y Mohr, 1971), permanganato de potasio (Utakoji, 1972) y dodecil sulfato de sodio (Yosida y Sagai, 1972). Una variante metodológica la constituye el pretratamiento con enzimas proteolíticas. Dutrillaux y col. (1971) emplearon exitosamente pronasa. Seabright (1971) desarrolló un método simple en base al pretratamiento con tripsina.

Debido a la sencillez metodológica y a que no son necesarios equipos o aparatos muy costosos para su análisis, las bandas G son las más empleadas en la actualidad para estudios citogenéticos.

4. Bandas R

En 1971 Dutrillaux y Lejeune encontraron que cuando los preparados se incuban en buffer fosfato a 86-87° C durante 10 minutos y se colorean con Giemsa, se producen bandas que constituyen la imagen opuesta de las bandas G o Q. Por este motivo se las denominó bandas en reverso o bandas R (Conferencia de Paris, 1971).

5. Otras bandas

La introducción de variantes de distinta magnitud en todas estas técnicas dio lugar al desarrollo de innumerables métodos que inducen distintos tipos de bandeo. Así, pueden mencionarse las bandas Cd, que se obtienen por pretratamiento con solución de Earle a pH 8,5-9,0 a 85° C durante 45 minutos y que se evidencian como dos puntos simétricos en la región del centrómero, de igual tamaño para todos los cromosomas (Eiberg, 1974). Las bandas T (Dutrillaux, 1973), que aparecen como regiones más intensamente teñidas en los telómeros y que se ponen en evidencia por tratamiento en solución de Earle a pH5, a 80-85° C y coloración con naranja de acridina. También se han desarrollado varias técnicas de coloración argéntica que ponen de manifiesto las regiones cromosómicas que actúan como organizadores del nucléolo (Goodpasture y Bloom, 1975; Miller y col., 1976).

6. Naturaleza de las bandas Q, G y R

La hipótesis inicial de Casperson y col. (1968) de que las bandas Q de fluorescencia intensa correspondían a regiones cromosómicas ricas en G-C fue descartada ante las evidencias en sentido contrario que surgieron de los trabajos de Ellison y Barr (1972) y Weisblum y De Haseth (1973) quienes por medio de métodos radioautográficos y colorímetricos demostraron que la fluorescencia de la quinacrina aumenta cuando se une a ADN rico en bases A-T y disminuye cuando se une a ADN rico en bases G-C. Del mismo modo, mediante el empleo de anticuerpos específicos para adenosina y citosina, capaces de unirse al ADN de cromosomas fijados, fue posible demostrar que las bandas Q de mayor fluorescencia y las bandas G más intensamente coloreadas correspondían a regiones ricas en A-T y las interbandas o regiones de menor fluorescencia o menos teñidas en bandeo Q o G, a regiones ricas en G-C. (Dev y col., 1972). Las bandas R, al contrario, presentan mayor coloración en las zonas ricas en G-C.

Otra evidencia en tal sentido es la obtenida con la inducción de bandas R en cromosomas de cerdo luego de cultivar linfocitos en presencia de 5-bromodesoxiuridina (BrdU), un análogo de la timina Este análogo de base se incorpora al ADN en sustitución de la timina y tiene la propiedad de disminuir la fluorescencia diferencial, induciendo una fluorescencia uniforme con quinacrina u otro fluorocromo semejante. Del mismo modo, los cromosomas de cerdo que tienen la timina de una cadena de ADN reemplazada por BrdU, al ser incubados con buffer fosfato a 55°C y subsecuentemente coloreados con Giemsa, presentan bandas R (Dulout y col., en prensa). Esto se explica porque las regiones ricas en A-T pierden su afinidad por el colorante al efectuarse el reemplazo de la timina por BrdU, mientras que las regiones ricas en G-C mantienen la coloración con Giemsa, de manera que aparecen más intensamente coloreadas.

Todas estas evidencias demuestran que mediante distintas técnicas de bandeo es posible individualizar cada par cromosómico por su modelo de bandas, lo que significa caracterizar cada cromosoma por la forma de distribución de bases en el ADN.

De esta manera, los cromosomas compartidos serán aquellos cromosomas o segmentos cromosómicos de especies filogenéticamente relacionadas que tienen: a) igual tamaño y morfología; b) igual cronología y modelo de duplicación; c) igual localización y magnitud de bandas C (ADN repetido); d) igual distribución y modelo de bandas Q, G o R (igual distribución de regiones ricas en A-T o G-C respectivamente).

7. Bandeo cromosómico y taxonomía.

El empleo de las técnicas de bandeo en estudios taxonómicos ha sido y es muy grande. La posibilidad de poder establecer relaciones filogenéticas con certeza ha alentado a la revisión citogenética de diversas taxa, lo que ha contribuido a dilucidar una serie considerable de incógnitas.

En el género *Rattus*, distintas subespecies de *Rattus rattus* muestran el fenómeno de multiformidad cromosómica, con poblaciones de 2n = 42 y 2n = 38 cromosomas en distintas partes del mundo (Bianchi y col., 1969; Yosida y col., 1971; Capanna y Civitelli, 1971; Reig y col., 1972). Al hacer el estudio citogenético de una población de *Rattus rattus alexandrinus* de 2n = 38 cromosomas (Dulout y col., 1976) se compararon los modelos de bandas G de esta especie y la rata albina, *Rattus norvegicus*, de 2n = 42 cromosomas. Se constató la semejanza de ambos modelos de bandeo, confirmando observaciones anteriores (Yosida y Sagai, 1971). Los cariotipos de ambas especies son iguales excepto por la presencia en *R. rattus alexandrinus* de dos pares de cromosomas metacéntricos (cromosomas 3 y 4) ausentes en *R. norvegicus*. Cuando se comparan los modelos de bandas G de ambos cariotipos se observa que todos los pares cromosómicos de *R. novergicus* son homologables con los de *R. rattus alexandrinus* incluyendo los pares 3 y 4 de ésta, ya que el brazo largo del cromosoma 3 tiene la misma distribución de bandas G que el cromosoma 3 de *R. norvegicus* en tanto que el brazo corto se homologa con el cromosoma 6. Los brazos largo y corto del cromosoma 4 de *R. rattus alexandrinus* tienen el mismo modelo de bandas que los cromosomas 9 y 12 de *R. norvegicus* respectivamente.

Estos resultados demuestran que mediante el análisis de bandas G es posible determinar las semejanzas cariotípicas de dos especies, como así mismo los reordenamientos cromosómicos que han tenido lugar.

Otro ejemplo claro de la utilización de las bandas G en citotaxonomía lo constituye el análisis comparativo efectuado en *Akodon molinae, Akodon azarae* y *Akodon obscurus* (Bianchi y col., 1976). En este trabajo se determinó que las 3 especies comparten 10 pares de cromosomas o segmentos cromosómicos; *A. molinae* y *A. azarae* comparten 3 pares entre sí; *A. molinae* y *A. obscurus* 1 par y *A. azarae* y *A. obscurus* 1 par (Tabla IV). Este análisis de las bandas G en tres especies filogenéticamente relacionadas pone en evidencia de manera clara la utilidad del análisis de los cariotipos por medio de técnicas de didiferenciación longitudinal para análisis taxonómicos y filogenéticos. Si se analiza en términos numéricos, *A. molinae* comparte el 61,9% de su cariotipo con *A. azarae* y el 52,3 % con *A. obscurus*. En el mismo sentido, *A. azarae* comparte el 68,4% de sus cromosomas con *A. molinae* y el 57,8% con *A. obscurus* y a su vez, el 64,7% del cariotipo de *A. obscurus* está compartido con las otras dos especies respectivamente. Partiendo del concepto ya expuesto de que los cromosomas compartidos provienen del ancestro común, resulta que *A. molinae* y *A. azarae* estarían filogenéticamente más próximos entre sí que con respecto a *A. obscurus*, aún cuando *A. molinae* exhibe 6 pares de cromosomas no compartidos con las otras dos especies y éstas solamente 3 cada una.

Se han efectuado gran número de observaciones semejantes en especies filogenéticamente relacionadas. Stock y Hsu (1973) compararon las bandas G del mono Rhesus (*Macaca mulatta*) con las del mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*) y las del hombre. Los cromosomas 8-20 y XY del mono Rhesus

son homologables con los cromosomas B 1-7 y C 1-5 del mono verde. Además, simulando fusiones Robertsonianas de los cromosomas acrocéntricos del mono verde se homologa todo el cariotipo con Rhesus excepto el par B 12. En relación al ser humano, los cromosomas A 1, A 7, B 2 y X del mono Rhesus se homologan con los cromosomas humanos 1, 5, 12 y X respectivamente. A su vez, los cromosomas 14 y 15 del hombre presentan la misma disposición de bandas que los cromosomas A 6 y A 7 del mono verde.

Otros trabajos han comparado el cariotipo humano con el del chimpanzé (Turleau y de Grouchy, 1972 y 1973; Bobrow y Madan, 1973; Chiarelli y Lin, 1972; Egozcue y col., 1973) por medio de diversas técnicas, demostrando que el hombre comparte 11 pares de cromosomas con el chimpancé (cromosomas 3, 6, 7, 8, 11, 13, 14, 19, 21, 22 y X).

En Artiodactyla se demostró la homología entre los cromosomas de la oveja y la cabra (Nadler y col., 1974). En aves Stock y Mengden (1975) encontraron que el cromosoma Z es compartido por la paloma común (*Columba livia*), la paloma de collar (*Streptopelia risoria*) y la gallina (*Gallus domesticus*).

Estos pocos ejemplos sirven para demostrar la utilidad de las distintas técnicas de bandeo para estudios citotaxonómicos, evidenciando la ventaja que representa poder conocer el ordenamiento molecular grueso de los cromosomas.

IV. Perspectivas futuras

Hemos analizado el paulatino crecimiento del concepto de cromosoma compartido a partir de los estudios estrictamente morfométricos. Las técnicas desarrolladas hasta el presente nos permiten conocer la cronología de duplicación cromosómica, la ubicación de determinadas familias de ADN caracterizadas por poseer secuencias de bases repetidas y la localización de las regiones ricas en A-T o en G-C en el cromosoma. El concepto último y definitivo de cromosoma compartido, del cual las técnicas actuales son meras aproximaciones, es el de aquellos cromosomas o segmentos cromosómicos de especies filogenéticamente relacionadas que tienen los mismos genes ordenados funcional y estructuralmente de la misma manera.

Actualmente se están dando los primeros pasos en este sentido. Los puntos de partida para el mapeo genético de los cromosomas han sido las técnicas de hibridación de células somáticas (Ephrussi y Weiss, 1965; Ephrussi, 1966; Ruddle, 1973) y el desarrollo de la genética de células en cultivo (Ruddle, 1973). Mediante estos métodos ha sido posible, por ejemplo, la ubicación en el brazo corto del cromosoma X humano de los genes para Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD), fosfogliceratoquinasa (PGK), hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa (HGPRT) (Ricciuti y Ruddle, 1973).

Estos y otros resultados permiten pensar que no está lejano el momento en que sea posible determinar el ordenamiento de determinados genes en determinados cromosomas y basar gran parte de los estudios filogenéticos y taxonómicos en estos hechos.

BIBLIOGRAFIA

ARRIGHI, F. E. y HSU, T. C., 1971. Localization of heterochromatin in human chromosomes. Cytogenetics, *10*; 81-86.

BIANCHI, N. O. y BIANCHI, M. S. de., 1965. DNA replication sequence of human chromosomes in blood cultures. Chromosoma, *17*, 273-296.

BIANCHI, N. O. y MOLINA, O. J., 1966. Chronology and pattern of replication in the bone marrow chromosomes of *Gallus domesticus*. Chromosoma, *21*; 387-397.

BIANCHI, N. O. y BIANCHI, M. S. de., 1968. Origin of the pattern and chronology of chromosome replication in Vertebrates. Proc. Symp. Nuclear Physiology and Differentiation. Genetics (Suppl.) *61*; 275-287.

BIANCHI, N. O., DULOUT, F. N. y CONTRERAS, J. 1968. Sex chromosome replication and sex chromatin in *Akodon azarae* (Rodentia, Cricetidae). J. Theor. Appl. Genet., *38*; 343-347.

BIANCHI, N. O., CONTRERAS, J. R. y DULOUT, F. N., 1969. Intraspecies autosomal polymorphism and chromosome replication in *Akodon molinae* (Rodentia, Cricetidae). Canad. J. Genet. Cytol., *11*. 233-242.

BIANCHI, N. O., PAULETE-VANRELL, J. y VIDAL RIOJA, L. A. de., 1969. Complement with 38 chromosomes in Two South American populations of *Rattus rattus*. Experientia, *25*: 1111-1112.

BIANCHI, N. O.; REIG, O. A.; MOLINA, O. J. y DULOUT, F. N. 1971. Cytogenetics of South American Akodont Rodents (Cricetidae). I. A Progress report of Argentinian and Venezuelan forms. Evolution, *25*(4); 724-736.

BIANCHI, N. O., VIDAL RIOJA, L. y BIANCHI, M. S., 1976. Cytogenetics of the South American Akodont Rodents. II. Interspecific homology of G-banding pattern. Cytologia, *41*: 139-144.

BOBROW, M. y MADAN, K., 1973. A comparison of chimpanzee and human chromosomes using the Giemsa-11 and other chromosome banding techniques. Cytogenet. Cell Genet., *12*; 107-116.

BRITTEN, R. J. y KOHNE, D. E., 1968. Repeated DNA sequences. Science, *161*: 529-540.

CAPANNA, E. y CIVITELLI, M. V., 1971. On the chromosomic polymorphism of *Rattus rattus* L. A study of West-European population. Experientia, *27*: 583-584.

CASPERSON, T., FARBER, S., FOLEY, G., KUDYNOWSKI, J., MODEST, E. J., SIMONSSON, E., WAGH, U. y ZECH, L., 1968. Chemical differentiation along metaphase chromosomes. Exp. Cell. Res. *49*; 219-222.

CITOLER, P. y GROPP, A., 1969. DNS-replikation von autosomalem heterochromatin. Exp. Cell. Res. *54*: 337-346.

CITOLER, P.; GROPP, A. y NATARAJAN, A. T., 1972. Timing of DNA replication of autosomal heterochromatin in the hedgehog. Cytogenetics, *11*: 53-62.

CHIARELLI, B. y LIN, C. C., 1972. Comparison of fluorescence patterns in human and chimpanzee chromosomes. Genen Phaenen, *15*: 103-106.

DEV, V. G., WARBURTON, D., MILLER, O. J., MILLER, D. A., ERLANGER, B. F. y BEISER, S. M., 1972. Consistent pattern of binding of anti-adenosine antibodies to human metaphase chromosomes. Exp. Cell. Res., *74*: 288-293.

DEV, V. G., WARBURTON, D. y MILLER, O. J., 1972. Giemsa banding of chromosomes. Lancet, i: 1285.

DULOUT, F. N.; ADRIS, A. E. S. de; PONSSA, R. M. y DULOUT, L. L. 1974. Chromosome heteromorphism and DNA replication pattern in the Guinea Pig, *Cavia porcellus porcellus* (L) Cabrera (Rodentia, Caviidae). Genet Ibérica, *26-27*: 1-17.

DULOUT, F. N.; ADRIS, A. E. S. de, PONSSA, R. M. y DULOUT, L. L., 1976. Citogenética y análisis de bandas C y G en una población de *Rattus rattus alexandrinus* Geoffroy de 2n = 38 cromosomas. Mendeliana, *1*(1):31-39.

DULOUT, F. N., BIANCHI, N. O., BIANCHI, M. S. de y LEZANA, E. A. Longitudinal differentiation of pig chromosomes with the BrdU-Giemsa method. Base composition of G- and R-bands. Proc. Joint Seminar "Aspects of the Chromosome Organization and Function". Ed. UNESCO (en prensa).

DRETS, M. E. y SHAW, M. W., 1971. Specific banding patterns of human chromosomes. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, *68*: 2073-2077.

DUTRILLAUX, B. y LEJEUNE, J., 1971. Sur une nouvelle technique d'analyse du caryotype humain. C. R. Acad. Sci. Paris, *272*; 2638-2640.

DUTRILLAUX, B., de GROUCHY, J., FINAZ, C. y LEJEUNE, J., 1971. Mise en évidence de la structure fine des chromosomes humains par digestion enzymatique (pronase en particulier). C.R. Acad. Sci. Paris, *273*: 587-588.

DUTRILLAUX, B. 1973. Nouveau système de marquage chromosomique: les bandes T. CHROMOSOMA, *41*: 395-402.

EIBERG, H. 1974. New selective Giemsa technique for human chromosomes, Cd staining. NATURE, *248*: 55.

ELLISON, J. R. y BARR, H. J., 1972. Quinacrine fluorescence of specific chromosome regions: late replication and high A:T content in *Samoaia leonensis*. Chromosoma, *36*: 375-390.

EPHRUSSI, B. y WEISS, M. C., 1965. Interspecific hybridization of somatic cells. Proc. Nat. Acad. Sci., *53*: 1040-1042.

EPHRUSSI, B., 1966. Interspecific somatic hybrids. In Vitro, *2*: 40-45.

EGOSCUE, J., CABALLIN, R. y GODAY, C., 1973. Banding patterns of the chromosomes of man and the chimpanzee. Humangenetik, *18*: 77-80.

FRACCARO, M., GUSTAVSSON, I., HULTEN, M., LINDSTEN, J. y TIEPOLO, L., 1969. Late replicating y -chromosome in espermatogonia of the chinese hamster (*Cricetulus griseus*).- Cytogenetics, *8*: 263-271.

GOODPASTURE, C. y BLOOM, S. E., 1975. Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. Chromosoma, *53*: 37-50.

JONES, K. W., 1970. Chromosomal and nuclear localization of mouse satellite DNA in individual cells. Nature, *225*: 912-915.

KATO, H. y MORIWAKI, K., 1972. Factors involved in the production of banded structures in mammalian chromosomes. Chromosoma, *38*: 105-120.

LIMA DE FARIA, A. y JAWORSKA, H., 1968. Late DNA synthesis in heterochromatin. Nature, *217*: 138-141.

LOMHOLT, B. y MOHR, J., 1971. Human karyotyping by heat-Giemsa staining and comparison with fluorochrome techniques. Nature New Biology, *234*: 109-110.

MARTIN, P., 1966. The pattern of autosomal DNA replication in four tissues of the chinese hamster. Exp. Cell. Res. *44*: 413-420.

MILLER, O. J., MILLER, D. A., DEV, V. G., TATRAVAHI, R. y CROCE, C. M., 1976. Expression of human and supression of mouse nucleolus organizer activity in mouse-human somatic cell hybrids. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, *73*: 4531-4535.

NADLER, C. F., HOFFMAN, R. S. y WOOLF, A., 1974, G-band patterns, chromosomal homologies, and evolutionary relationships among wild sheep, goats, and Aoudads (Mammalia, Artiodactyla). Experientia, *30*: 744-746.

NESBITT, M. N. y GARTLER, R. S. M., 1970. Replication of the mouse sex chromosomes early in the S period. Cytogenetics. *9*: 212-221.

PARDUE, M. L. y GALL, J. G., 1970, Chromosomal localization of mouse satellite DNA. Science, *168*: 1356-1358.

PARIS CONFERENCE ON STANDARDISATION IN HUMAN CYTOGENETICS, 1971. Birth defects. Original Article Series. The National Foundation March of Dimes.

PATIL, S. R., MERRICK, S. y LUBS, H. A., 1971. Identification of each human chromosome with a modified Giemsa stain. Science, *173*: 821-822.

REIG, O. A., PINCHEIRA, J. V., SPOTORNO, A. O. y WALLER, P., 1972. New evidence of a 38-chromosomes karyotype in South American populations of the roof rat, *Rattus Rattus* L. (Rodentia, Muridae).- Experientia, *28*: 971-972.

RICCIUTI, F. C. y RUDDLE, F. H., 1973. Assignment of three gene loci (PGK, HGPRT, G6PD) to the long arm of the human X chromosome by somatic cell genetics. Genetics, *74*: 661-678.

RIS, H. y KUBAI, D. F., 1970. Chromosome structure. Ann. Rev. Genet. *4*: 263-294.

RUDDLE, F. H., 1973. Linkage analysis using somatic cell hybrids. Adv. Human Genet. *3*: 173-235.

SCHMID, W., 1967. Heterochromatin in mammals. Arch. Julius Klaus Stift Vererbungforsch., *42*: 1-60.

SCHMID, W. y LEPPERT, M. F., 1969. Rates of DNA synthesis in heterochromatic and euchromatic segments of the chromosome complements of two rodents. Cytogenetics, *8*: 125-135.

SCHNEDL, W., 1971. Analysis of the human karyotype using a reassociation technique.- Chromosoma, *34*: 448-454.

SEABRIGHT, M., 1971. A rapid banding technique for human chromosomes. Lancet, ii: 971-972.

SHIRAISHI, Y. y YOSIDA, T. H., 1972. Banding pattern analysis of human chromosomes by use of urea treatment technique. Chromosoma, *37*: 75-83.

SISKEN, J. E., 1964. Methods for measuring the lengh of the mitotic cycle and the timing of DNA synthesis for mammalian cells in culture. Methods in Cell Physiology, Academic Press, New York, pp. 387-401.

STOCK, A. D. y HSU, T.C., 1973. Evolutionary conservatism in arrangement of genetic material. Chromosoma, *43*: 211-224.

STOCK, A. D. y MENGDEN, G. A. 1975. Chromosome banding pattern conservatism in birds and nonhomology of chromosome banding patterns between birds, turtles, snakes and amphibians. Chromosoma, *50*: 69-77.

SUMNER, A. T., EVANS, H. J. y BUCKLAND, R. A., 1971. A new technique for distinguishing between human chromosomes. Nature New Biology, *232*: 31-32.

TAYLOR, J. H., WOODS, P. S. y HUGHES, W. L., 1957. The organization and duplication of chromosomes as revealed by autoradiographic studies using tritium labeled thymidine. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, *43*: 122-138.

TAYLOR, J. H., 1960. Asynchronous duplication of chromosomes in cultured cells of Chinese hamster. J. Biphys. Biochem. Cytol., *7*: 455-464.

TAYLOR, J. H., 1963. The replication and organization of DNA in chromosomes. Molecular Biology, Academic Press, New York, pp. 65-108.

TURLEAU, C. y DE GROUCHY, J., 1972. Caryotypes de l'homme et du chimpanzé. Comparaison de la topographie des bandes. Mécanismes évolutifs possibles. C. R. Acad. Sci. Paris, *274*: 2355-2357.

TURLEAU, C. y de GROUCHY, J., 1973. New observations on the human and chimpanzee karyotypes. Humangenetik, *20*: 151-157.

UTAKOJI, T., 1972. Differential staining patterns of human chromosomes treated with potassium permanganate. Nature, *239*: 168-170.

WEISBLUM, B., de HASETH, P. L., 1973. Nucleotide specificity of the quinacrine staining reaction for chromosomes. Chromosomes Today, *4*: 35-51.

YOSIDA, T. H., TSUCHIYA, K. y MORIWAKI, K., 1971. Karyotypic differences of black rats, *Rattus rattus* collected in various localities of East and Southwest Asia and Oceania. Chromosoma, *33*: 252-267.

YOSIDA, T. H. y SAGAI, T., 1971. Similarity of banding pattern of metaphase chromosomes in black and Norway rats. Rep. Nat. Inst. Genet.

Misima, *22*: 38-39.

YOSIDA, T. H. y SAGAI, T., 1972. Banding pattern analysis of polymorphic karyotypes in the black rat by a new differential staining technique. Chromosoma, *37*: 387-394.

ZAKHAROV, A. F. y EGOLINA, N. A., 1968. Asynchrony of DNA replication and mitotic spiralization along heterochromatic portions of Chinese hamster chromosomes. Chromosoma, *23*: 365-385.

TABLA I

Tamaño del cromosoma 1 del autosoma más pequeño en distintas especies de *Akodon*. Las dimensiones están expresadas en porcentaje del complejo haploide. Tomado de Bicnhi *et al.* 1971.

ESPECIE	CROMOSOMA 1			Autosoma más pequeño
A. obscurus	10,1 ± 0,72			1,9 ± 0,42
A. azarae	10,9 ± 0,63			1,7 ± 0,51
A. varius simulator	10,9 ± 0,83			1,7 ± 0,38
A. varius neocenus	10,7 ± 0,62			1,7 ± 0,40
A. boliviensis tucumanensis	11,1 ± 0,64			1,7 ± 0,36
A. boliviensis spegazzinii	10,6 ± 0,59			1,8 ± 0,46
Bolomys albiventer	10,8 ± 0,70			1,8 ± 0,46
A. longipilis	6,2 ± 0,52			1,7 ± 0,43
A. xanthorhinus	6,0 ± 0,45			1,8 ± 0,42
	Brazo largo	Brazo corto	Total	
A. dolores	10,3 ± 0,78	8,9 ± 0,68	19,2 ± 0,88	1,8 ± 0,32
A. molinae	10,2 ± 0,74	8,1 ± 0,64	18,3 ± 0,86	1,9 ± 0,42
A. urichi venezuelensis	10,5 ± 0,63	9,5 ± 0,48	20,0 ± 0,86	2,0 ± 0,55
A. illuteus	11,4 ± 0,63	4,1 ± 0,32	15,5 ± 0,53	1,9 ± 0,48

TABLA II

Tamaño de los cromosomas compartidos entre *Didelphis azarae* y *Lutreolina crassicaudata* expresado en porcentaje del complejo haploide. Tomado de Bianchi y Bianchi, 1969.

Especie	Pares autosómicos									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
D. azarae	14,03	13,08	12,08	9,32	8,63	8,21	8,11	8,01	7,73	7,01
L. crassicaudata	14,32	13,20	12,46	9,30	8,60	8,41	8,05	7,69	7,05	6,8[illegible]

TABLA III

Tamaño y relación de brazos de los cromosomas 1, 2 y 3 de *Boa constrictor amarali* (B. c. c.) *Xenodon merremii* (X. m.), *Phylodrias patagonensis* (P. p.) y *Bothrops jararaca* (B. j.). El tamaño de los cromosomas se expresa en porcentaje del complejo haploide. Tomado de Bianchi y Bianchi, 1969.

	Cromosoma 1		Cromosoma 2		Cromosoma 3	
	Tamaño	Relación Brazos	Tamaño	Relación Brazos	Tamaño	Relación Brazos
B.c.c.	21,8 ± 1,1	1,06	17,9 ± 1,2	1,54	13,01 ± 0,7	1,15
X.m.	21,9 ± 1,2	1,07	17,8 ± 1,2	1,56	12,8 ± 0,62	1,13
Ph.p.	22,0 ± 1,01	1,06	18,2 ± 0,98	1,55	13,01 ± 0,61	1,13
B.j.	22,2 ± 1,07	1,07	18,1 ± 1,01	1,57	12,9 ± 0,50	1,14

TABLA IV

Correspondencia de los modelos de bandas G entre pares cromosómicos de *A. molinae*, *A. azarae* y *A. obscurus*. Tomado de Bianchi *et al.*, 1976.

A. molinae	1(BL)	1(BC)	2	3	4	6	7	8	–	9	–	10
A. azarae	1	3	2	4	5	7	–	8	–	9	10	–
A. obscurus	1	2	3	4	5	7	–	8	9	÷	–	10
A. molinae	11	–	12	13	–	–	14	–	15	–	16	17
A. azarae	11	–	12	–	13	–	–	14	15	16	–	17
A. obscurus	11	12	–	–	–	13	–	–	–	14	–	15
A. molinae	18	19	20	X	–	–	Y	–	–			
A. azarae	–	–	18	–	X	–	–	Y	–			
A. obscurus	–	–	16	–	–	X	–	–	Y			